

# マルチスケール分子シミュレーションによる 受容体チロシンキナーゼの構造モデリング

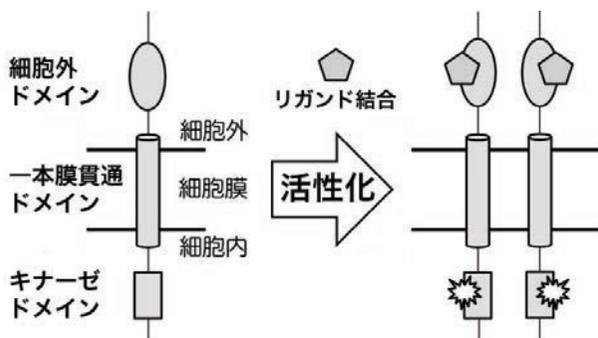
森 義 治

神戸大学大学院システム情報学研究科

## 1. はじめに

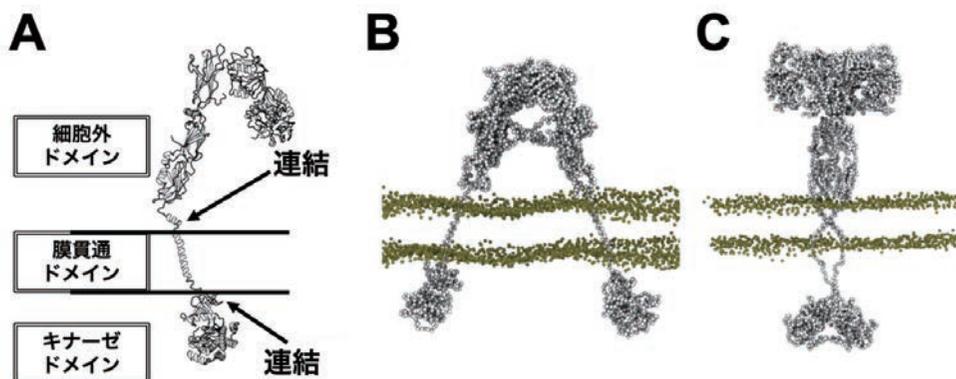
受容体チロシンキナーゼは細胞内領域のリン酸化を介して細胞内外のシグナル伝達を担っており、ヒトをはじめとする生物の細胞において重要な役割を果たしている。受容体チロシンキナーゼの例として上皮成長因子受容体やインスリン受容体などがあり、細胞増殖や代謝過程の調節を行っている。これらのタンパク質の機能が失われたり過剰に発現したりした場合には、がんや代謝の疾患などの原因となると考えられている。原子レベルにおける構造的観点からみれば受容体チロシンキナーゼは膜タンパク質であり、第1図に示したような一般的な構造を持っている。細胞外にはシグナルを受け取るための領域が存在し、細胞内にはチロシンキナーゼドメイン（タンパク質のリン酸化を担う領域）を持つ。これらの構成部分が膜貫通部分でつながれており、この膜貫通部分は一本の  $\alpha$  ヘリックス構造からなる。シグナル分子が細胞外の領域に結合することにより受容体が活性化され、細胞内のチロシンキナーゼドメインが機能を発現するようになる。またシグナル分子によって活性化されたチロシンキナーゼは多くの場合に二量体で機能していると考えられているが、多量体構造をとる場合もあると考えられている[1]。

受容体チロシンキナーゼは典型的な膜貫通タンパク質であるが、上記のように重要な機能を担っているにもかかわらず、その原子レベルでの全体構造は X 線・NMR・電子顕微鏡のような実験によってほとんど明らかになっていない[2]。これは構造的特徴として述べたように、ただ一本からなる膜貫通領域の非常に柔軟な構造に起因していると考えられる。細胞外からのシグナルを細胞内部に伝える機構を解明するためには、このようなタンパク質全長の構造を明らかにすることが不可欠である。



第1図：受容体チロシンキナーゼの概念図。

受容体チロシンキナーゼは細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよびキナーゼドメインから構成される。リガンド分子が結合することにより一般的に二量体が形成される。



第2図：インスリン受容体の構造モデリング。

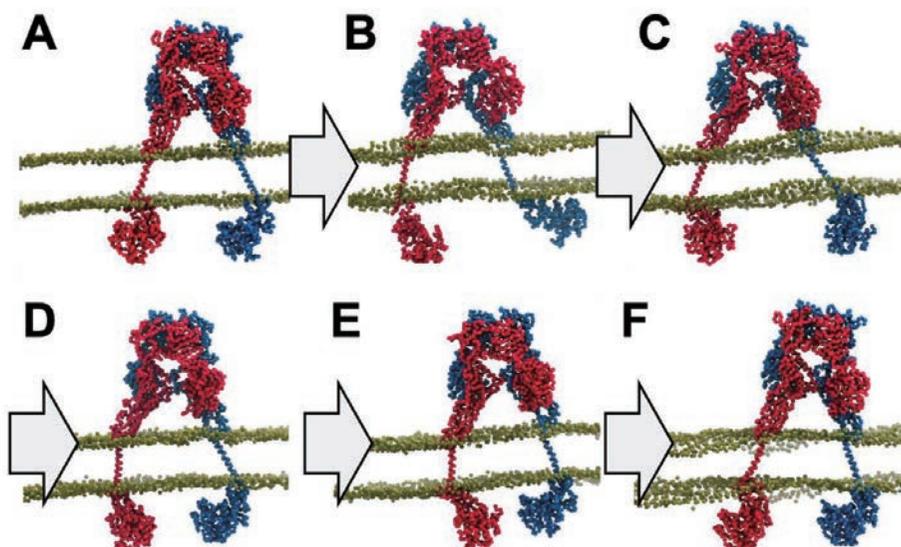
A：それぞれのドメインを連結することによりインスリン受容体の全長構造が作成される。B：リガンド非結合型におけるインスリン受容体の構造モデル。C：活性状態におけるインスリン受容体の構造モデル。

以上のように受容体チロシンキナーゼの機能の全容を解明するためには、シグナル分子の結合による活性化とそれに伴う細胞膜を介した情報の伝達の機構を理解する必要がある。このようなことを実現するために、受容体チロシンキナーゼの全長構造をモデリングし、全体構造における分子動態を明らかにすることを目的とした。詳細は次節において述べるが、概要は以下の通りである。実験的に細胞外ドメイン・膜貫通ドメイン・キナーゼドメインのそれぞれの構造は決定されている場合もあり、これらを鋳型としてお互いを連結したモデルを作成した（第2図）。このように得られた受容体チロシンキナーゼの構造モデルを次の方法で精密化した。まず粗視化分子シミュレーションを利用して全体的な構造のサンプリングを実行した。さらに、このように得られた様々な粗視化構造の妥当性を全原子分子シミュレーションを実行することにより理解した。

## 2. 受容体チロシンキナーゼの構造モデリングと分子動力学シミュレーション

対象とする系である受容体チロシンキナーゼは膜貫通領域に柔軟な部分を持っており、実験においてもいまだに全体構造の原子レベルでの十分な構造決定ができていない。また標準的な全原子分子動力学シミュレーションでは、そのような部分における構造揺らぎを十分にサンプリングすることは計算量が非常に多くなるため困難であると考えられる。そこで本研究ではまず実験的に決定されている領域を連結することにより粗視化された系を構築し、受容体チロシンキナーゼ・細胞膜・水溶媒の粗視化分子動力学シミュレーションを実行した。この方法により全原子モデルと比較して長い時間スケールを追いかけることができ、大規模な構造変化をとらえることが可能となる。

本研究においては受容体チロシンキナーゼの一種であるインスリン受容体を用いた[3]。インスリン受容体は生体内の代謝に関わっており、ホルモンであるインスリンを結合し血糖値のコントロールに関わるタンパク質のひとつである。インスリン受容体の構造的特徴として、リガンド（インスリン）非結合の状態においてジスルフィド結合を介してすでに二量体を形成していることが挙げられる。その他の受容体チロシンキナーゼは一般的にリガンドが結合することにより多



第3図：シミュレーションにおけるインスリン受容体のスナップショット。

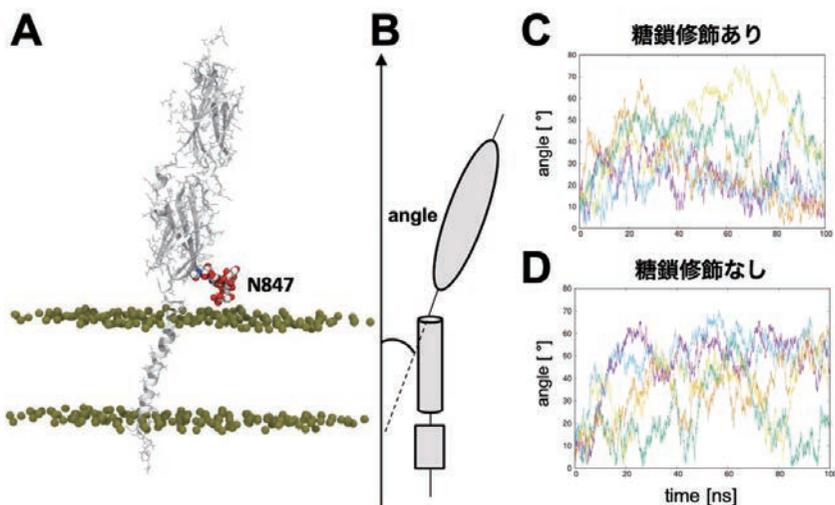
A-F：リガンド非結合型インスリン受容体の時間発展を示している。AからFにかけて時間が経過している。

量体化すると考えられている。現在までにインスリン受容体のリガンド非結合状態および活性状態（リガンド結合状態）における細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに細胞内ドメインのそれぞれの構造がX線結晶構造解析等により決定されている。しかしながら全長の構造は決定されていないため、リガンド非結合状態および活性状態のインスリン受容体の全長構造モデリングを行った。これまでに得られている構造を鋳型としてModellerソフトウェアによりホモロジーモデリングを実行することにより全長の構造を作成し（第2図A）、分子動力学シミュレーションの初期構造とした。リガンド非結合状態におけるインスリン受容体の全体構造を第2図Bに、活性状態におけるインスリン受容体の全体構造を第2図Cに示す。

作成した初期構造を基にして粗視化分子動力学シミュレーションを実行することにより、全体構造の構造緩和が生じるようにし、より適切な全体構造を得た。粗視化シミュレーションは次のような条件で行った。粗視化モデルとしてタンパク質・脂質・水分子・イオンすべてをMARTINI力場(ver. 2.2)で取り扱った。またタンパク質の三次構造が鮮明な領域においてはElastic Network Model[4]を使用することにより分子構造が壊れるような大規模な構造変化が生じないようにした。リガンド非結合状態・活性状態ともに系の全粒子数はおよそ20万となった。計算はReedbush-Hスーパーコンピュータシステムにより実行し、それぞれの系において $3\mu\text{s}$ の粗視化分子動力学シミュレーションを5回実行した。分子動力学シミュレーションはGROMACS(ver. 2018.8)により実行された。

### 3. 結果・議論

粗視化シミュレーションの結果、受容体チロシンキナーゼにおける様々な構造をサンプルすることができた（第3図A-F）。まずリガンド非結合状態の構造モデルにおいては細胞内のキナーゼドメインが膜に接触するような構造変化が見られた（第3図A）。また活性状態の構造モデル



第4図：インスリン受容体細胞外ドメインにおける糖鎖の効果。

A：糖鎖が結合したインスリン受容体部分の全原子シミュレーションモデル。B：細胞外ドメインの傾きの定義。  
C, D：糖鎖修飾がある系(C)およびない系(D)における細胞外ドメインの傾きの時間発展。

においてはキナーゼドメインが二量体化していることが重要であるため、適切な構造を保ったまま脂質と結合していることが分かった。膜貫通領域は、特にリガンド非結合状態の構造が大きく変化した。膜貫通領域の初期構造は細胞外ドメインの構造から予測されるように作成したため平衡構造から大きく離れている可能性が高かったが、実際に粗視化シミュレーションを実行することで二量体の膜貫通領域同士がより近くなるような位置に配置されることが分かった(第3図E, F)。以上の二つの領域の大きな構造変化にもかかわらず、細胞外ドメインは多くの場合実験で得られた構造に近い構造が保持されることが分かり、全体として安定なシミュレーションが実行できていることを確認することができた。

以上のような結果とともに、リガンド非結合状態・活性化状態のどちらの状態においてもいくつかの構造不安定性も見られた。特に目立った構造変化は細胞外ドメインが直立した構造を維持できないために生じているようであった。つまり、いくつかの計算においては細胞外ドメインが脂質膜に接触するような構造変化が生じた。このような構造変化は細胞外ドメインが直立した構造で安定的に得られていることと不整合である。このように受容体チロシンキナーゼ全長の構造はいくらか不安定であることが分かった。この原因として、通常受容体チロシンキナーゼの細胞外ドメインに付加されている糖鎖の影響を無視していたことが考えられた[5]。この糖鎖付加による構造安定性を明らかにするために、糖鎖を付加した細胞外ドメインの一部と膜貫通ドメインおよび脂質二重膜からなる系における全原子分子動力学シミュレーションを実行した。全原子分子動力学シミュレーションは次のような条件で行った。インスリン受容体部分構造においてアミノ酸残基 N847 に生体中に見られる最低限の糖鎖修飾をした系を用意した(第4図A)。また比較のために糖鎖修飾を行っていない同様の系も用意した。全原子数はそれぞれの系でおよそ 23 万であった。力場として CHARMM36m を使用し、100 ns の分子動力学シミュレーションをそれぞれの系で 5 回実行した。

以上の計算から糖鎖修飾されたインスリン受容体の細胞外ドメインは直立した構造を安定的

に取ることが分かった（第4図 B-D）。糖鎖は細胞膜と相互作用し、タンパク質が傾いた場合にそれを防ぐような働きをしていると考えられる。一方で糖鎖修飾がない細胞外ドメインは粗視化シミュレーションで見られたものと同様な構造変化が見られた。つまり、細胞外ドメインが倒れこみ、細胞膜の脂質分子とタンパク質の全領域が接触するような構造を見ることができた。

以上述べてきたように、インスリン受容体を用いた受容体チロシンキナーゼにおける構造モデリングおよびその構造に基づく粗視化分子動力学シミュレーション、そしてこれらの考察を基にした全原子分子動力学シミュレーションから構造変化の詳細に係る知見を得ることができた。本研究により行われたような方法を用いることにより、受容体の構造変化を詳細に理解できるようになり、ひいては細胞内外を介したシグナル伝達機構を明らかにすることができるようになっていくことが期待される。

## 謝 辞

本研究は2019年度東京大学情報基盤センター「若手・女性利用者推薦」課題「マルチスケール分子シミュレーションによる受容体チロシンキナーゼの構造モデリング」の支援により実施されました。

## 参 考 文 献

- [1] R. Trenker and N. Jura, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 63, 174-185, 2020.
- [2] T. Gutmann et al., *J. Cell Biol.*, 217, 1643-1649, 2018.
- [3] G. Scapin et al., *Nature*, 556, 122-125, 2018.
- [4] X. Perirole et al., *J. Chem. Theory Comput.*, 5, 2531-2543, 2009.
- [5] G. Enkavi et al., *Chem. Rev.*, 119, 5607-5774, 2019.